



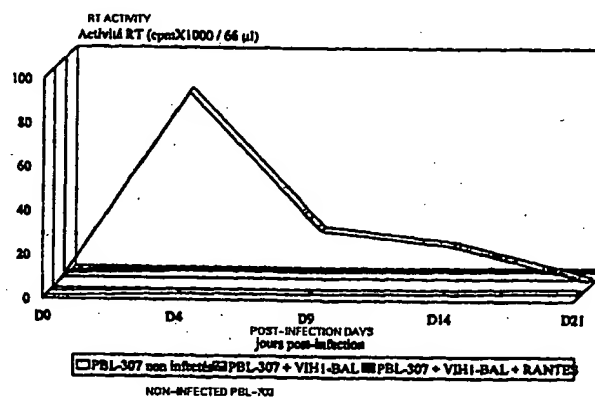
## DEMANDE INTERNATIONALE PUBLIÉE EN VERTU DU TRAITE DE COOPERATION EN MATIÈRE DE BREVETS (PCT)

|   |  |  |  |
|---|--|--|--|
| (51) Classification internationale des brevets <sup>6</sup> :<br><b>C12N 15/86, C07K 14/52, A61K 48/00,<br/>C07K 14/715</b>   |  | <b>A1</b>  | (11) Numéro de publication internationale: <b>WO 99/27122</b>          |
|   |  |  | (43) Date de publication internationale: <b>3 juin 1999 (03.06.99)</b> |
| (21) Numéro de la demande internationale: <b>PCT/FR98/02503</b>   |  | (81) Etats désignés: AU, CA, JP, US, brevet européen (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE).   |  |
| (22) Date de dépôt international: <b>23 novembre 1998 (23.11.98)</b>  |  |  |  |
| (30) Données relatives à la priorité:<br><b>97/14672 21 novembre 1997 (21.11.97) FR</b>   |  | <b>Publiée</b><br><i>Avec rapport de recherche internationale.<br/>Avant l'expiration du délai prévu pour la modification des revendications, sera republiée si des modifications sont reçues.</i> |  |
| (71) Déposant (pour tous les Etats désignés sauf US): <b>TRANSGENE S.A. [FR/FR]; 11, rue de Molsheim, F-67000 Strasbourg (FR).</b>  |  |  |  |
| (72) Inventeurs; et<br>(75) Inventeurs/Déposants (US seulement): <b>MEHTALI, Majid [FR/FR]; 16, impasse de Reims, F-67400 Illkirch Graffenstaden (FR). SORG, Tania [FR/FR]; 3, impasse du Ruisseau, F-67330 Dossenheim sur Zinsel (FR). CALEND, Valérie [FR/FR]; 6, rue des Baillis, F-67000 Strasbourg (FR). MARIGLIANO, Martine [FR/FR]; 1, rue Jean Jaurès, F-67300 Schiltigheim (FR).</b> |  |  |  |
| (74) Mandataires: <b>MARTIN, Jean-Jacques etc.; Cabinet Regimbeau, 26, avenue Kléber, F-75116 Paris (FR).</b>   |  |  |  |

(54) Title: **VECTORS INHIBITING OR DELAYING THE BINDING OF AN IMMUNODEFICIENCY VIRUS TO CELLS**(54) Titre: **VECTEURS INHIBANT OU RETARDANT LA LIAISON D'UN VIRUS D'IMMUNODEFICIENCE AUX CELLULES**

## (57) Abstract

The invention concerns a recombinant viral vector in whose genome are inserted the sequences coding for at least a polypeptide for inhibiting or delaying the binding of an immunodeficiency virus to a target cell and/or the penetration of said virus into said cell, said viral vector not being an adenovirus vector in whose genome is inserted the DNAC coding for the murine RANTES. It also concerns an infectious viral particle, a host cell and a pharmaceutical composition comprising said vector, viral particle or host cell. It further concerns a method for preparing such an infectious viral particle. Finally, it concerns the therapeutic or prophylactic use of a viral vector, a viral particle, a host cell, an adenovirus vector expressing the murine RANTES and a plasmid vector comprising the sequences coding for at least a polypeptide for inhibiting or delaying the binding of an immunodeficiency virus to a target cell and/or the penetration of said virus into said cell, for preparing a medicine for the treatment immunodeficiency-related diseases using gene therapy.



## (57) Abrégé

La présente invention concerne un vecteur viral recombinant dans le génome duquel sont insérées les séquences codant pour au moins un polypeptide permettant d'inhiber ou retarder la liaison d'un virus d'immunodéficience à une cellule cible et/ou la pénétration dudit virus dans ladite cellule, ledit vecteur viral n'étant pas un vecteur adénoviral dans le génome duquel est inséré l'ADNc codant pour le RANTES murin. Elle a également trait à une particule virale infectieuse, une cellule hôte et une composition pharmaceutique comprenant ledit vecteur, particule virale ou cellule hôte. Elle concerne également un procédé de préparation d'une telle particule virale infectieuse. Enfin, elle concerne l'utilisation thérapeutique ou prophylactique d'un vecteur viral, d'une particule virale, d'une cellule hôte, d'un vecteur adénoviral exprimant le RANTES murin ainsi que d'un vecteur plasmidique comprenant les séquences codant pour au moins un polypeptide permettant d'inhiber ou retarder la liaison d'un virus d'immunodéficience à une cellule cible et/ou la pénétration dudit virus dans ladite cellule, pour la préparation d'un médicament destiné au traitement des maladies d'immunodéficience par thérapie génique.

# UNIQUEMENT A TITRE D'INFORMATION

Codes utilisés pour identifier les Etats parties au PCT, sur les pages de couverture des brochures publiant des demandes internationales en vertu du PCT.

|    |                           |    |   |    |  |    |                       |
|----|---------------------------|----|---|----|--|----|-----------------------|
| AL | Albanie                   | ES | Espagne                                       | LS | Lesotho                                  | SI | Slovénie              |
| AM | Arménie                   | FI | Finlande                                      | LT | Lituanie                                 | SK | Slovaquie             |
| AT | Autriche                  | FR | France  | LU | Luxembourg                               | SN | Sénégal               |
| AU | Australie                 | GA | Gabon   | LV | Lettonie                                 | SZ | Swaziland             |
| AZ | Azerbaïdjan               | GB | Royaume-Uni                                   | MC | Monaco                                   | TD | Tchad                 |
| BA | Bosnie-Herzégovine        | GE | Géorgie                                       | MD | République de Moldova                    | TG | Togo                  |
| BB | Barbade                   | GH | Ghana   | MG | Madagascar                               | TJ | Tadjikistan           |
| BE | Belgique                  | GN | Guinée  | MK | Ex-République yougoslave<br>de Macédoine | TM | Turkménistan          |
| BF | Burkina Faso              | GR | Grèce   | ML | Mali                                     | TR | Turquie               |
| BG | Bulgarie                  | HU | Hongrie                                       | MN | Mongolie                                 | TT | Trinité-et-Tobago     |
| BJ | Bénin                     | IE | Irlande                                       | MR | Mauritanie                               | UA | Ukraine               |
| BR | Brésil                    | IL | Israël  | MW | Malawi                                   | UG | Ouganda               |
| BY | Bélarus                   | IS | Islande                                       | MX | Mexique                                  | US | Etats-Unis d'Amérique |
| CA | Canada                    | IT | Italie  | NE | Niger                                    | UZ | Ouzbékistan           |
| CF | République centrafricaine | JP | Japon   | NL | Pays-Bas                                 | VN | Viet Nam              |
| CG | Congo                     | KE | Kenya   | NO | Norvège                                  | YU | Yougoslavie           |
| CH | Suisse                    | KG | Kirghizistan                                  | NZ | Nouvelle-Zélande                         | ZW | Zimbabwe              |
| CI | Côte d'Ivoire             | KP | République populaire<br>démocratique de Corée | PL | Pologne                                  |    |                       |
| CM | Cameroun                  | KR | République de Corée                           | PT | Portugal                                 |    |                       |
| CN | Chine                     | KZ | Kazakhstan                                    | RO | Roumanie                                 |    |                       |
| CU | Cuba                      | LC | Sainte-Lucie                                  | RU | Fédération de Russie                     |    |                       |
| CZ | République tchèque        | LI | Liechtenstein                                 | SD | Soudan                                   |    |                       |
| DE | Allemagne                 | LK | Sri Lanka                                     | SE | Suède                                    |    |                       |
| DK | Danemark                  | LR | Libéria                                       | SG | Singapour                                |    |                       |
| EE | Estonie                   |    |   |    |  |    |                       |

## VECTEURS INHIBANT OU RETARDANT LA LIAISON D'UN VIRUS D'IMMUNODEFICIENCE AUX CELLULES

5           La présente invention a pour objet de nouveaux vecteurs permettant l'expression d'un polypeptide permettant d'inhiber ou retarder la liaison d'un virus d'immunodéficience à une cellule hôte et/ou la pénétration dudit virus dans ladite cellule ainsi que leur utilisation pour prévenir ou traiter une maladie d'immunodéficience et notamment le syndrome de l'immunodéficience acquise  
10       (SIDA) résultant de l'infection par le virus de l'immunodéficience humaine (VIH).

          Le SIDA se développe à la suite d'une infection par le virus VIH des lymphocytes T4 d'un individu. L'infection peut être asymptomatique pendant de nombreuses années, mais dès que les cellules sont activées, le virus se réplique rapidement et les détruit. Le SIDA se caractérise par un déficit de l'immunité  
15       cellulaire, qui a pour effet de rendre l'individu particulièrement sensible à toute infection opportuniste. En juillet 1992, l'OMS a enregistré 501 272 cas de SIDA dans le monde (AIDS Information international literature on acquired immunodeficiency syndrom and related retroviruses, 1992, 8, Leeds University Press. Editor A.W. Boylston, Leeds). Mais ces chiffres sont toutefois inférieurs à la  
20       réalité, puisque cette maladie constitue une véritable épidémie dans certains pays africains. A l'heure actuelle, malgré le fait que les traitements de chimiothérapie aient permis d'augmenter l'espérance de vie des malades, le SIDA reste une maladie dont le taux de mortalité est toujours très élevé.

          Le VIH est un rétrovirus qui appartient à la famille des lentivirus. Comme  
25       tout rétrovirus, il est formé d'une enveloppe entourant une capside de nature protéique, qui contient le matériel génétique constitué par une molécule d'ARN associée à diverses protéines virales nécessaires aux premières étapes du cycle réplicatif. Dès 1984, on a mis en évidence le rôle déterminant de la molécule CD4 présente essentiellement à la surface des lymphocytes T CD4+ et des monocytes,

dans la pénétration du virus au sein des cellules cibles.

De nombreuses observations accumulées au cours de ces 10 dernières années, ont suggéré l'existence de cofacteurs supplémentaires. Récemment, l'équipe de Berger a identifié le rôle du récepteur à 7 domaines transmembranaires, désigné  
5 initialement fusine et rebaptisé depuis lors CXCR-4 (Oberlin et al., 1996, Nature 382, 833-835 ; Feng et al., 1996, Science 272, 872-877), pour permettre la pénétration du virus suite à l'interaction de l'enveloppe virale et du récepteur CD4. Son ligand SDF-1 (pour stromal cell-derived factor 1 en anglais) semble bloquer efficacement l'infection des lignées lymphocytaires par les isolats VIH-1 adaptés aux  
10 lignées immortalisées et les T-tropiques.

En outre, plusieurs groupes ont montré que les isolats à tropisme macrophage primaires ou adaptés aux lignées immortalisées utilisent un corécepteur différent pour infecter les cellules hôtes. Le récepteur CCR-5, toujours en association avec CD4, permet l'entrée de ces souches (Dragic et al., 1996, Nature  
15 381, 667-673 ; Alkhatib et al., 1996, Science 272, 1955-1958). Ce récepteur lie normalement le RANTES (pour regulated on activation, normal T cell expressed and secreted en anglais), MIP-1 $\alpha$  et MIP-1 $\beta$  (pour MAC inhibitory protein en anglais) et ces  $\beta$ -chimiokines répriment la pénétration du virus dans les cellules, probablement par un phénomène de compétition et/ou d'internalisation du complexe  
20 récepteur/ligand. L'effet inhibiteur est supprimé en présence d'anticorps dirigés contre ces trois molécules (Cocchi et al., 1995, Science 270, 1811-1815).

Les premiers essais envisagés jusqu'à présent, mettent en oeuvre les chimiokines précitées sous forme purifiée, des antagonistes qui bloquent les récepteurs ou encore des anticorps dirigés contre le récepteur. Cependant,  
25 l'administration de telles molécules pose un certain nombre de problèmes, notamment dû au fait qu'elles sont métabolisées très rapidement dans l'organisme ce qui nécessite l'administration de fortes doses et de façon répétée et augmente le coût du traitement. La présente invention permet de remédier aux inconvénients de l'art antérieur et propose des vecteurs plus appropriés exprimant les ligands SDF-1,

RANTES, MIP-1 $\alpha$  ou MIP-1 $\beta$  ou leurs dérivés, dans le but d'augmenter leur efficacité tout en diminuant les effets indésirables. Un adénovirus recombinant exprimant l'ADNc codant pour le RANTES murin a déjà été décrit dans la littérature (Braciak et al., 1996, J. Immunol. 157, 5076-5084) mais son utilisation à des fins  
5 anti-SIDA n'est pas enseignée.

On a maintenant montré que les cellules lymphocytaires incubées en présence de surnageants de cellules infectées par des vecteurs adénoviraux défectifs exprimant le RANTES sont protégées contre la réplication du VIH. Les expériences en modèles murins confirment la persistance du vecteur adénoviral, celui-ci pouvant  
10 être détecté dans le foie des animaux traités pendant plus de 60 jours après l'injection.

C'est pourquoi la présente invention a pour objet un vecteur viral recombinant dans le génome duquel est inséré les séquences codant pour au moins un polypeptide permettant d'inhiber ou retarder la liaison d'un virus  
15 d'immunodéficience à une cellule cible et/ou la pénétration dudit virus dans ladite cellule, ledit vecteur viral n'étant pas un vecteur adénoviral dans le génome duquel est inséré l'ADNc codant pour le RANTES murin.

Au sens de la présente invention, un vecteur viral fait référence à un virus dont le génome a été modifié de manière à permettre le transfert et l'expression d'un  
20 gène d'intérêt dans une cellule ou un organisme hôte eucaryote. Un vecteur viral susceptible d'être mis en oeuvre dans le cadre de la présente invention, peut être dérivé notamment d'un poxvirus, d'un virus de l'herpès, d'un alphavirus, d'un rétrovirus, d'un adénovirus ou d'un virus associé à l'adénovirus. Avantageusement, il s'agira d'un vecteur non intégratif et non réplicatif. De tels vecteurs ainsi que leur  
25 technique de préparation sont connus de l'homme de l'art.

A cet égard, les adénovirus offrent plusieurs avantages qui en font des vecteurs de choix dans le cadre de la présente invention. En effet, ils infectent de nombreux types cellulaires, aussi bien des cellules en division que quiescentes, sont non-intégratifs et peu pathogènes. A titre indicatif, leur génome est constitué d'une

molécule d'ADN linéaire et bicaténaire d'environ 36 kb portant plus d'une trentaine de gènes, à la fois des gènes précoces nécessaires à la réplication virale et des gènes tardifs de structure. Les gènes précoces sont répartis en 4 régions (désignées E1 à E4 ; E pour early signifiant précoce en anglais). Les régions E1, E2 et E4 sont  
5 essentielles à la réplication virale alors que la région E3 impliquée dans la modulation de la réponse immunitaire anti-adénovirus chez l'hôte ne l'est pas. Les gènes tardifs (L1 à L5 ; L pour late signifiant tardif en anglais) recouvrent en partie les unités de transcription précoces et sont, pour la plupart, transcrits à partir du promoteur majeur tardif MLP (pour Major Late Promoter en anglais).

10       Avantageusement, un vecteur adénoviral selon l'invention est déficient pour la réplication, c'est à dire incapable de réplication autonome dans une cellule hôte. Généralement, un tel vecteur est obtenu à partir d'un adénovirus dont le génome a été modifié de manière à rendre non fonctionnels un ou plusieurs gènes viraux essentiels à sa réplication. Ces modifications peuvent être diverses (délétion,  
15 mutation et/ou addition d'un ou plusieurs nucléotides) et localisées dans les régions codantes du génome viral ou en dehors de celles-ci, par exemple dans les régions promotrices.

Un vecteur adénoviral préféré selon l'invention est dépourvu de la majorité de la région E1 et, de façon optionnelle, de tout ou partie de la région E3. Il peut en  
20 outre comprendre des délétions ou mutations supplémentaires affectant un ou plusieurs autres gènes viraux, notamment au sein des régions E2, E4 et/ou L1-L5. A cet égard, on peut avoir recours aux vecteurs de seconde génération de l'état de la technique (voir par exemple les demandes internationales WO94/28152 et WO97/04119). A titre illustratif, la délétion de la majorité de la région E1 et d'une  
25 partie de l'unité de transcription E4 est tout particulièrement avantageuse. On indique qu'un vecteur adénoviral selon l'invention conserve les régions *en cis* du génome adénoviral à savoir les répétitions inversées terminales (ITR) et la région d'encapsidation. Leur longueur et séquence nucléotidique peuvent varier d'un sérotype à l'autre. Cependant, elles peuvent être aisément isolées à partir des

données de la littérature. A titre indicatif, les ITRs correspondent aux premiers et derniers 103 nucléotides (nt) des extrémités 5' et 3' du génome de l'adénovirus de type 5 (Ad5) et la région d'encapsidation s'étend jusqu'au nt 458.

Une autre variante intéressante peut consister en des mutations ou des  
5 déléctions limitées, ne nécessitant pas de complémentation des fonctions touchées. On peut citer par exemple la mutation thermosensible de la région E2 (Ensinger et al., 1972, J. Virol. 10, 328-339) ou la délétion partielle de la région E4 conservant notamment les séquences codant pour les cadres de lecture ouverts (ORF)<sub>3</sub> et/ou 6 et 7 qui ne nécessite pas de complémentation de la fonction E4 (Ketner et al.,  
10 1989, Nucleic Acids Res. 17, 3037-3048). En outre, le maintien de ORFs 3, 3 et 4 ou 3, 6 et 7 peut s'avérer avantageux en terme d'expression du transgène. Il est également possible d'avoir recours à un vecteur minimal conservant essentiellement les régions en *cis* essentielles à la réplication (ITRs et région d'encapsidation) et défectif pour l'ensemble des fonctions vitales.

15 Comme déjà mentionné, le vecteur adénoviral selon l'invention est, de façon optionnelle, en outre dépourvu de tout ou partie de la région E3 non essentielle afin d'accroître les capacités de clonage. Cependant, on peut envisager de conserver les séquences E3 codant pour les polypeptides permettant l'échappement au système immunitaire de l'hôte, notamment la glycoprotéine gp19k (Gooding et al., 1990,  
20 Critical Review of Immunology 10, 53-71)

Un vecteur adénoviral préféré selon l'invention est choisi parmi les suivants :

- (1) vecteur adénoviral dépourvu de tout ou partie de la région E1 et, de manière optionnelle, de tout ou partie de la région E3,
- (2) vecteur adénoviral dépourvu de tout ou partie des régions E1 et E2 et, de  
25 manière optionnelle, de tout ou partie de la région E3,
- (3) vecteur adénoviral dépourvu de tout ou partie des régions E1 et E4 et, de manière optionnelle, de tout ou partie de la région E3,
- (4) vecteur adénoviral dépourvu de tout ou partie des régions E1 et E4 et, de manière optionnelle, de tout ou partie de la région E3, et comportant une

mutation non fonctionnelle de la région E2, et

- (5) vecteur adénoviral dépourvu de tout ou partie des régions E1, E2 et E4 et, de manière optionnelle de tout ou partie de la région E3.

Par ailleurs, l'origine du vecteur adénoviral selon l'invention, peut être variée  
5 aussi bien du point de vue de l'espèce que du sérotype. Il peut dériver du génome d'un adénovirus d'origine humaine ou animale (canine, aviaire, bovine, murine, ovine, porcine, simienne...) ou encore d'un hybride comprenant des fragments de génome adénoviral d'au moins deux origines différentes. On peut citer plus particulièrement les adénovirus CAV-1 ou CAV-2 d'origine canine, DAV d'origine aviaire ou encore  
10 Bad de type 3 d'origine bovine (Zakharchuk et al., Arch. Virol., 1993, 128: 171-176 ; Spibey et Cavanagh, J. Gen. Virol., 1989, 70: 165-172 ; Jouvenne et al., Gene, 1987, 60: 21-28 ; Mittal et al., J. Gen. Virol., 1995, 76: 93-102). Cependant, on préférera un vecteur adénoviral d'origine humaine dérivant de préférence d'un adénovirus de sérotype C, notamment de type 2 ou 5.

- 15 Un vecteur adénoviral selon la présente invention peut être généré *in vitro* dans *Escherichia coli* (*E. coli*) par ligation ou recombinaison homologue (voir par exemple la demande internationale WO96/17070) ou encore par recombinaison dans une lignée de complémentation.

Comme indiqué précédemment, la caractéristique essentielle du vecteur viral  
20 selon l'invention est de porter au sein de son génome les séquences codant pour au moins un polypeptide permettant d'inhiber ou retarder les premières étapes d'une infection virale, le vecteur viral n'étant pas un vecteur adénoviral exprimant l'ADNc codant pour le RANTES murin.

Selon un mode de réalisation avantageux, le polypeptide en usage dans la  
25 présente invention est un ligand d'un récepteur cellulaire, ce dernier facilitant la liaison et/ ou la pénétration d'un virus d'immunodéficience au sein de la cellule cible. Sa liaison au récepteur inhibe au moins partiellement la liaison et/ou l'entrée du virus au sein de la cellule cible. L'inhibition peut être mesurée par les techniques classiques, par exemple en évaluant l'activité de la transcriptase inverse du virus, la



présence de protéines virales (p24 pour le virus VIH) ou par des tests d'inhibition de fusion tels que décrits dans Dragic et al. (1996, *supra*) et Alkhatib et al. (1996, *supra*).

Le polypeptide en usage dans la présente invention est de préférence choisi  
5 parmi les ligands d'un récepteur facilitant, éventuellement en association avec CD4, la liaison et/ou la pénétration du virus VIH-1 dans la cellule cible. On peut citer les chimiokines liant le récepteur CCR-5, CXCR-4, CCR-2B, CCR-3, US28, BOB (ou GPR-15) ou encore BONZO (ou STRL-33) (Pleskoff et al., 1997, Science 276,1874-1878 ; Deng et al., 1997, Nature 388, 296-300 ; Liao et al., 1997, J. Exp.  
10 Med. 185, 2015-2023). Les récepteurs qu'il convient également de considérer dans le cadre de la présente invention sont CCR1 (J.Virol., vol 72, no.7, pages 6260-6263, 1998) ; GPR1 (Virology 249, pages 367-378, 1998) ; CCR8 (J.Biol.Chem., 273 (1), pages 386-391, 1998 ; J. Virol. 71, no.12, pages 8999-9007, 1997) ; V28 ou CX3CR (Virology 231, pages 130-134, 1997 ; J. Virol. 71, no.12, pages 8999-  
15 9007, 1997) ; le récepteur putatif de MDC (Science, 278, pages 695-698 1997) ; APJ et CCR9 (J.Virol., Vol 72, no 10, pages 7934-7940, 1998).

Parmi ces ligands, on mentionnera le MDC (pour macrophage derived chemokine ; Pal et al., 1997, Science 278, 695-698), le v-MIPII (Kaposi's sarcoma-associated herpes virus ; Kledal et al., 1997, Science 277, 1656-1659) et plus particulièrement  
20 le RANTES, le MIP-1 $\alpha$ , le MIP-1 $\beta$  et le SDF-1, notamment d'origine humaine.

On rappelle ci-après les propriétés des polypeptides précités.

Le RANTES est produit essentiellement par les lymphocytes du sang périphérique, les macrophages et les cellules T. Il présente plusieurs activités parmi lesquelles la chimioattraction portant sur les monocytes et les cellules CD4+/CD45  
25 RO<sup>+</sup>. Il comporte 68 acides aminés. Sa séquence est décrite dans Schall et al. (1988, J. Immunol. 141, 1018-1045).

Le MIP-1 $\alpha$  est produit essentiellement par les lymphocytes T et les monocytes. Il permet la chimioattraction portant sur les monocytes et, à moindre

échelle, sur les lymphocytes T. En outre, il inhibe la prolifération des précurseurs hématopoïétiques. Sa séquence est décrite dans Obaru et al. (1986, J. Biochem. 99, 885-894).

Le MIP-1 $\beta$  est produit essentiellement par les lymphocytes T et les  
5 monocytes. Il permet la chimioattraction portant sur les monocytes et, à moindre échelle, sur les lymphocytes T. En outre, il inhibe la prolifération des précurseurs hématopoïétiques. Sa séquence est décrite dans Brown et al. (1989, J. Immunol. 142, 679-687).

Le SDF-1 est produit essentiellement par les cellules stromales et de la  
10 moelle osseuse. Il intervient dans la chimioattraction portant principalement sur les lymphocytes. Sa séquence est décrite dans Tashiro et al. (1993, Science 261, 600-603).

Dans le cadre de la présente invention, on peut mettre en oeuvre un polypeptide natif ou un dérivé de ce dernier. Il peut être obtenu par mutation,  
15 substitution, addition et/ou délétion d'un ou plusieurs résidus du polypeptide natif sous réserve qu'il soit capable d'exercer l'effet inhibiteur recherché vis à vis de l'infection virale. De préférence, un dérivé en usage dans l'invention retient les capacités de liaison au récepteur mais a une activité biologique réduite ou nulle. En effet, il peut être avantageux de supprimer ou réduire les activités biologiques du  
20 polypeptide, afin de minimiser les effets secondaires indésirables. A cet égard, un dérivé antagoniste convient tout particulièrement. A titre d'exemples de dérivés antagonistes du RANTES, on peut citer le RANTES pourvu d'un résidu Met à l'extrémité N-terminale de la protéine mature (Proudfoot et al., 1996, J. Biol. Chem. 271, 2599 -2603), l'aminooxypentane-RANTES ou AOP-RANTES (Science 276,  
25 pages 276-279, 1997) et le RANTES délété des 8 premiers résidus en position N-terminale (ci-après désigné RANTES  $\Delta$ 1-8 ; Arenzana-Seisdedos et al., 1996, Nature 383, 400) qui ne présentent plus les propriétés chimiotactiques et d'activation des monocytes caractérisant le RANTES natif.

A titre d'exemple de dérivé antagoniste de SDF-1, on peut citer le peptide

correspondant aux 9 résidus N-terminaux de SDF-1 (Loetscher et al., 1998, J.Biol.Chem. Vol.273, no.35, pages 22279-22283).

Les séquences nucléotidiques codant pour le polypeptide en usage dans la présente invention peuvent être isolées selon les techniques de l'art (PCR, reverse  
5 transcription, synthèse chimique, utilisation de sondes adéquates...). Il peut s'agir de séquences génomiques, ADNc qui peuvent être modifiées par exemple au niveau des introns (type minigène). Leur insertion dans le génome du vecteur viral selon l'invention a, de préférence, lieu dans une région non essentielle ou au sein d'une région modifiée/délétée. S'agissant d'un vecteur adénoviral, le site de clonage préféré  
10 est en remplacement de E1. Dans le cas où l'on met en oeuvre plusieurs séquences nucléotidiques, elles peuvent être insérées au même endroit ou à des endroits différents du génome viral, utiliser les mêmes éléments de régulation ou des éléments différents et, éventuellement, être en orientation reverse les unes par rapport aux autres afin de minimiser les phénomènes d'interférence au niveau de l'expression  
15 génique.

Bien entendu, les séquences nucléotidiques sont placées sous le contrôle des éléments nécessaires à leur expression dans une cellule hôte. La locution "éléments nécessaires à l'expression" désigne les éléments génétiques permettant la transcription de la séquence nucléotidique en ARN et la traduction d'un ARNm en  
20 polypeptide. Parmi ceux-ci, le promoteur revêt une importance particulière. Il peut être isolé d'un gène quelconque d'origine eucaryote ou même virale et peut être constitutif ou régulable. Alternativement, il peut s'agir du promoteur naturel du gène en question. Par ailleurs, il peut être modifié de manière à améliorer l'activité promotrice, supprimer une région inhibitrice de la transcription, rendre un promoteur  
25 constitutif régulable ou vice versa, introduire un site de restriction... Le choix d'un promoteur est à la portée de l'homme de l'art et sera adapté au vecteur viral retenu. On peut mentionner, à titre d'exemples, les LTR rétroviraux adaptés à un vecteur rétroviral, le promoteur 7,5K du virus de la vaccine ou encore les promoteurs eucaryotes des gènes PGK (Phospho Glycerate kinase), d'immunoglobuline

(lymphocyte-spécifique), le promoteur SR $\alpha$  hybride entre l'origine de SV40 et le LTR de HTLV-I (Takebe et al., 1988, Mol. Cell. Biol. 8, 466-472), le promoteur SM22 $\alpha$  et le promoteur de la Desmine (demande de brevet WO 98/15575). Il est également envisagé dans le cadre de la présente invention d'utiliser des promoteurs

5 tissus spécifiques. Parmi les promoteurs tissus spécifiques, les promoteurs foie-spécifiques sont des promoteurs préférés. On peut notamment citer : le promoteur de l' $\alpha$ 1-Antitrypsine (Long et al., Biochemistry, 1984, 23, 4828-37 ; Yull et al, Transgenic Research, 4, 770-74 (1995)), le promoteur du Facteur IX (Salier et al., J. of Biol. Chem., 265, no.12, 7062-68, 1990), le promoteur du gène de l'Albumine

10 (Izban et al., J. Biol. Chem, 264, no.16, 9171-79, 1989), ces derniers promoteurs pouvant être couplés à l'Apo E enhancer dans le but d'augmenter le taux de transcription du gène placé sous le contrôle de ce promoteur (Shachter et al., Journal of Lipids research, vol 34, 1993, page 1699). On peut également avoir recours à un promoteur inductible par le virus HIV (LTR de HIV)

15 Dans le cadre d'un vecteur adénoviral, les promoteurs CMV précoce (Cytomégalovirus), RSV (Rous Sarcoma Virus) et les promoteurs foie-spécifiques éventuellement couplés à une séquence augmentant le taux de transcription telle que l'Apo E enhancer sont préférés.

Bien entendu, les séquences nucléotidique en usage dans le cadre de la

20 présente invention peuvent en outre comprendre des éléments additionnels améliorant leur expression, leur maintien dans la cellule hôte ou la localisation du polypeptide. De tels éléments sont connus de l'homme de l'art. On indique que la séquence nucléotidique en usage dans le cadre de la présente invention comporte de préférence une séquence signal permettant la sécrétion du polypeptide en dehors de

25 la cellule hôte. Il peut s'agir de la séquence signal native ou d'une séquence hétérologue issue d'un polypeptide eucaryote ou viral sécrété. En outre la présence d'une séquence d'épissage peut être avantageuse pour améliorer les niveaux d'expression. A cet égard, le second intron du gène  $\beta$ -globine de lapin (Green et al.,

1988, Nucleic Acid Res. 16, 369 ; Karasuyama et al., 1989, J. Exp. Med. 169, 13-25) ou la séquence d'épissage synthétique trouvée dans le plasmide pCI (promega Corp, pCI mammalian expression vector E1731 comprenant le site donneur de l'intron 1 de la  $\beta$ -globine humaine et le site accepteur du gène d'une immunoglobine de souris) constituent des exemples préférés.

Un vecteur viral selon l'invention particulièrement avantageux dérive d'un adénovirus dépourvu de l'essentiel des régions E1 et E3 et dans lequel est insérée à la place de la région E1 une cassette d'expression comportant le promoteur CMV ou RSV, une séquence d'épissage, l'ADNc codant pour le RANTES humain ou son dérivé RANTES  $\Delta$ 1-8 et une séquence de polyadénylation.

Par ailleurs, le vecteur viral selon l'invention peut comprendre des séquences nucléotidiques exogènes additionnelles codant pour un ou plusieurs polypeptides améliorant l'effet thérapeutique à l'égard de l'infection virale (anticorps neutralisants, immunoconjugués, immunotoxines...).

L'invention a également trait à une particule virale infectieuse ainsi qu'à une cellule hôte eucaryote comprenant un vecteur viral selon l'invention. Ladite cellule hôte est avantageusement une cellule de mammifère et, de préférence, une cellule humaine et peut comprendre ledit vecteur sous forme intégrée ou non dans son génome. Il s'agira de préférence d'une cellule souche ou différenciée hématopoïétique (cellule souche totipotente, leucocyte, lymphocyte, monocyte ou macrophage...).

Une particule virale infectieuse selon l'invention est préparée selon les techniques conventionnelles dans le domaine de l'art. Sa propagation est effectuée dans une cellule de complémentation adaptée aux déficiences qu'il porte. S'agissant d'un vecteur adénoviral, on aura par exemple recours à la lignée 293 établie à partir de cellules de rein embryonnaire humain, qui complémente efficacement la fonction E1 (Graham et al., 1977, J. Gen. Virol. 36, 59-72) ou des lignées en dérivant pour une double complémentation (Yeh et al., 1996, J. Virol. 70, 559-565 ; Krougliak et Graham, 1995, Human Gene Therapy 6, 1575-1586 ; Wang et al., 1995 Gene Therapy 2, 775-783 ; Lusky et al., 1998, J. of Virology, no. 72, 2022-2032 ;

demande de brevet internationale WO 97/04119). Mais d'autres lignées obtenues par transfection des séquences de complémentation appropriées peuvent convenir. On peut également employer des virus auxiliaires pour compléter tout ou partie des fonctions défectives.

5 L'invention concerne également un procédé de préparation d'une particule virale infectieuse comprenant un vecteur viral selon l'invention, selon lequel :

- (i) on introduit ledit vecteur viral selon l'invention dans une cellule de complémentation capable de compléter *en trans* ledit vecteur, de manière à obtenir une cellule de complémentation transfectée,
- 10 (ii) on cultive ladite cellule de complémentation transfectée dans des conditions appropriées pour permettre la production de ladite particule virale infectieuse, et
- (iii) on récupère ladite particule virale infectieuse dans la culture cellulaire.

15 Bien entendu, la particule virale infectieuse peut être récupérée du surnageant de culture mais également des cellules. Une des méthodes couramment employée consiste à lyser les cellules par des cycles consécutifs de congélation/décongélation pour recueillir les virions dans le surnageant de lyse. Ceux-ci peuvent être amplifiés et purifiés selon les techniques de l'art (procédé  
20 chromatographique, ultracentrifugation notamment à travers un gradient de chlorure de césium...).

L'invention a également pour objet une composition pharmaceutique comprenant à titre d'agent thérapeutique ou prophylactique, au moins un vecteur viral, une particule virale infectieuse ou une cellule hôte eucaryote selon l'invention  
25 en association avec un support acceptable d'un point de vue pharmaceutique.

Ainsi, la composition pharmaceutique de l'invention peut comprendre au moins un vecteur viral dans lequel est insérée une séquence codant pour au moins un polypeptide permettant d'inhiber ou retarder la liaison d'un virus d'immunodéficience à une cellule cible et/ou la pénétration dudit virus dans ladite cellule. Une telle

composition est apte à permettre la coexpression de plusieurs polypeptides possédant lesdites propriétés d'inhibition ou de retardement de la liaison d'un virus à une cellule hôte. Cette coexpression permet éventuellement auxdits polypeptides d'agir en synergie. Ainsi, la composition de l'invention peut comporter un vecteur  
5 viral contenant une séquence codant pour plusieurs polypeptides, les séquences nucléotidiques codant pour chacun des polypeptides peuvent être placées sous le contrôle du même promoteur, ou de promoteurs différents inductibles ou non. Ces séquences nucléotidiques peuvent en outre être insérées dans une région identique ou différente du génome viral et être orientées de manière identique ou inverse sur  
10 le vecteur. Les techniques permettant de concevoir les vecteurs dotés de telles caractéristiques sont bien connues de l'homme du métier. De manière alternative, la composition selon l'invention peut comporter plusieurs vecteurs viraux exprimant chacun un ou plusieurs peptides d'intérêt.

La composition selon l'invention est destinée au traitement préventif ou curatif des  
15 maladies liées à une infection par un virus d'immunodéficience et, tout particulièrement, par un virus VIH d'un sérotype quelconque. Il peut s'agir du VIH-1 ou du VIH-2 (Hill et al., 1997, J. Virol. 71, 6296-6304).

Une composition pharmaceutique selon l'invention peut être fabriquée de manière conventionnelle. En particulier, on associe une quantité thérapeutiquement  
20 efficace de l'agent thérapeutique ou prophylactique à un support acceptable d'un point de vue pharmaceutique. Les voies d'administration envisageables sont multiples (intragastrique, sous-cutanée, intracardiaque, intramusculaire, intrapéritonéale, intratumorale, intranasale, intrapulmonaire ou intratrachéale... etc). Mais, on préférera, une administration par voie intraveineuse, notamment dans le cas d'un  
25 vecteur adénoviral. Elle peut avoir lieu en dose unique ou répétée une ou plusieurs fois après un certain délai d'intervalle. La voie d'administration et le dosage appropriés varient en fonction de divers paramètres, par exemple, de l'individu à traiter, du stade de la maladie ou encore des séquences nucléotidiques à transférer. A titre purement indicatif, les particules virales selon l'invention peuvent être

formulées sous forme de doses comprises entre  $10^4$  et  $10^{15}$  ui (unités infectieuses), avantageusement  $10^3$  et  $10^{14}$  ui et, de préférence,  $10^6$  et  $10^{13}$  ui. La formulation peut également inclure un diluant, un adjuvant ou un excipient acceptable d'un point de vue pharmaceutique ou tout autre substance permettant d'améliorer l'effet antiviral ou la stabilité. Un exemple d'une telle substance peut être trouvée dans la demande française 97 06600.

La présente invention est relative à l'utilisation thérapeutique ou prophylactique d'au moins un vecteur viral, d'une particule virale infectieuse ou d'une cellule hôte eucaryote selon l'invention, pour la préparation d'un médicament destiné au traitement des maladies d'immunodéficience et, notamment du SIDA par thérapie génique.

Il est donc également envisagé dans le cadre de la présente invention l'utilisation d'au moins un vecteur viral dans lequel est insérée une séquence codant pour au moins un polypeptide permettant d'inhiber ou retarder la liaison d'un virus d'immunodéficience à une cellule cible et/ou la pénétration dudit virus dans ladite cellule. Une telle utilisation est apte à permettre la coexpression de plusieurs polypeptides possédant lesdites propriétés d'inhibition ou de retardement.

Cette coexpression permet éventuellement auxdits polypeptides d'agir en synergie. Lorsque il est prévu l'utilisation d'un vecteur viral contenant une séquence codant pour plusieurs polypeptides, les séquences nucléotidiques codant pour chacun des polypeptides peuvent être placées sous le contrôle du même promoteur, ou de promoteurs différents, inductibles ou non. Ces séquences nucléotidiques peuvent également être orientées de manière identique ou inverse sur le vecteur et être placée dans une même région virale ou non. Les techniques permettant de concevoir les vecteurs dotés de telles caractéristiques sont bien connues de l'homme du métier.

La présente invention concerne également l'utilisation thérapeutique ou prophylactique d'un vecteur adénoviral dans le génome duquel est inséré l'ADNc codant pour le RANTES murin ou d'un vecteur plasmidique comprenant les



séquences codant pour au moins un polypeptide permettant d'inhiber ou retarder la liaison d'un virus d'immunodéficience à une cellule cible et/ou la pénétration dudit virus dans ladite cellule, pour la préparation d'un médicament destiné au traitement des maladies d'immunodéficience par thérapie génique. Bien entendu, le polypeptide

5 en usage dans la présente invention a les caractéristiques énoncées ci-dessus, tout comme le vecteur adénoviral permettant l'expression de l'ADNc codant pour le RANTES murin. Pour ce qui est du vecteur plasmidique, on peut employer un plasmide de l'état de la technique ou le construire par les techniques de manipulations génétiques. Avantageusement, il possède les éléments génétiques lui

10 permettant de se répliquer et de se maintenir dans un microorganisme et/ou une cellule hôte, comme par exemple au moins une origine de réplication et un gène de sélection (gène codant pour une auxotrophie ou conférant une résistance à un antibiotique). Il peut également comprendre des éléments supplémentaires améliorant son maintien, sa stabilité ou encore son intégration dans les chromosomes

15 de l'hôte.

Un vecteur viral selon l'invention ou un vecteur plasmidique en usage dans la présente invention peut être utilisé tel quel ou en association avec d'autres composés, tels que des composés lipidiques cationiques éventuellement en présence de lipides neutres ou zwitterioniques. Ces composés sont largement décrits dans la littérature

20 accessible à l'homme du métier.

Selon une première possibilité, le médicament peut être administré directement *in vivo*, par exemple par injection intraveineuse. Le polypeptide sera sécrété dans le sang où il pourra exercer son action antivirale. On peut également adopter l'approche *ex vivo* qui consiste à prélever des cellules du patient (cellules souches de la moëlle

25 osseuse, lymphocytes du sang périphérique...), de les transfecter ou infecter *in vitro* selon les techniques de l'art et de les réadministrer au patient.

Enfin la présente invention a également pour objet une méthode de traitement ou de prévention du SIDA, selon laquelle on administre une quantité thérapeutiquement efficace d'un vecteur viral, d'une particule virale ou d'une cellule

hôte eucaryote selon l'invention ou d'un vecteur plasmique en usage selon l'invention à un patient ayant besoin d'un tel traitement.

### EXEMPLES

5 La présente invention est illustrée, sans pour autant être limitée, par les exemples suivants.

Les constructions décrites ci-dessous sont réalisées selon les techniques générales de génie génétique et de clonage moléculaire, détaillées notamment dans Maniatis et al., (1989, Laboratory Manual, Cold Spring Harbor, Laboratory Press,  
10 Cold Spring Harbor, NY) ou selon les recommandations du fabricant lorsqu'on utilise un kit commercial. La technique de recombinaison homologue est largement détaillée dans Chartier et al. (1996, J. Virol. 70, 4805-4810) et la souche utilisée à cet effet est de préférence la souche *E. coli* BJ 5183 (Hanahan, 1983, J. Mol. Biol. 166, 557-580). S'agissant de la réparation des sites de restriction, la technique employée consiste en  
15 un remplissage des extrémités 5' protubérantes à l'aide du grand fragment de l'ADN polymérase I d'*E. coli* (Klenow). Les techniques d'amplification par PCR (Polymérase Chain Reaction) sont connues de l'homme de l'art (voir par exemple PCR Protocols - A Guide to Methods and Applications, 1990, édité par Innis, Gelfand, Sninsky et White, Academic Press Inc). Pour la technique de transcription inverse PCR, on  
20 procède classiquement, tout d'abord à la transcription du complément inverse de l'ARNm à l'aide d'un oligonucléotide situé après le codon STOP puis à l'amplification de l'ADNc à l'aide de deux amorces adéquates. Par ailleurs, les fragments de génome adénoviral employés dans les différentes constructions décrites ci-après, sont indiqués précisément selon leur position dans la séquence nucléotidique du génome de l'Ad5  
25 telle que divulguée dans la banque de données Genebank sous la référence M73260.

En ce qui concerne la biologie cellulaire, les cellules sont transfectées ou transduites selon les techniques standards bien connues de l'homme du métier. Dans les exemples qui suivent, on a recours aux lignées cellulaires de complémentation 293 (Graham et al, 1977, *supra* ; disponible à l'ATCC sous la référence CRL1573) et

A549-E1+ résultant de la transfection de la lignée humaine A549 par un plasmide exprimant la région E1 de l'Ad5 sous le contrôle du promoteur PGK (voir WO 94/28152). Pour l'évaluation des virions, on utilise les cellules A549 (ATCC CCL-185), Vero (ATCC CCL-81) et PM1 (NIH AIDS Research and  
5 Reference Reagent Program Catalog # 3038). Il est entendu que d'autres lignées cellulaires peuvent être utilisées. Les cellules sont cultivées selon les techniques de l'art ou selon les recommandations du fournisseur.

EXEMPLE 1 : Construction d'un vecteur adénoviral exprimant le RANTES  
10 humain

L'ADNc codant pour le RANTES humain est cloné par transcription inverse-PCR (RT-PCR) à partir d'ARN isolés de lymphocytes humains activés pendant 3 jours en présence d'IL-2 et d'anticorps anti-CD3. La transcription-inverse est réalisée avec  
15 l'oligonucléotide oTG10794 (SEQ ID NO: 1), l'amplification par PCR avec les oligonucléotides oTG10793 (SEQ ID NO: 2) et oTG10794 en appliquant les conditions expérimentales suivantes : 30 cycles de 1 min à 94°C, 1 min à 62°C et 1 min 30 à 72°C). Le fragment amplifié (297 pb) est digéré par *Xba*I, purifié et inséré dans le vecteur M13TG130 (Kieny et al., 1983, Gene 26, 91-99) préalablement  
20 linéarisé par *Xba*I et déphosphorylé, pour donner le vecteur M13TG6219. La présence du gène RANTES est confirmé par digestion enzymatique (par exemple *Bgl*II-*Sac*II) et sa séquence nucléotidique par séquençage selon les méthodes de l'art.

Le vecteur de transfert adénoviral pTG6600 est généré par introduction au sein de la région E1 de l'Ad5 du fragment *Bgl*II-*Bam*HI isolé de pCI (Promega) et portant  
25 le promoteur CMV, une séquence d'épissage synthétique (site donneur  $\uparrow$ -globine humain/intron 1/site accepteur d'immunoglobuline IgG), un site multiple de clonage (MCS) et la séquence de polyadénylation du virus SV40 (voir la demande française 97 06757), de sorte que les éléments de régulation sont localisés en 3' des séquences

Ad5 s'étendant des nucléotides 1 à 458 et en 5' de celles en positions 3329 à 6241. Le fragment *XbaI* isolé de M13TG6219 codant pour l'ADNc RANTES est inséré au niveau du MCS, pour donner pTG6230. Le génome adénoviral recombinant désigné pTG6232 est reconstitué par recombinaison homologue entre le fragment *PacI-BstEII* de pTG6230 et le vecteur pTG4656 clivé par *ClaI*. Ce dernier est un vecteur adénoviral recombinant comprenant le gène LacZ en remplacement de la région E1.

En parallèle, le fragment *HindIII-EcoRV* de M13TG6219 est également inséré dans la région E1 du vecteur pTG8348 similaire au pTG6600 mis à part la constitution de la cassette d'expression. Celle-ci contient le promoteur viral RSV, l'intron 2 du gène  $\beta$ -globine de lapin et le signal de polyadénylation de ce même gène. On obtient pTG6254. Le vecteur adénoviral pTG6264 est construit par recombinaison homologue entre le vecteur pTG4656 digéré par *ClaI* et le fragment *PacI-BstEII* du vecteur de transfert pTG6254. On indique que pTG6264 est un vecteur délété des régions E1 (nt 459 à 3328) et E3 (nt 28592 à 30470) et comportant la cassette "prom RSV - intron - RANTES - pA  $\beta$ -globine" à la place des séquences E1.

Les virions AdTG6232 et AdTG6264 sont obtenus de la façon suivante : les plasmides correspondants sont transfectés dans la lignée de complémentation 293. Le surnageant cellulaire est récupéré après 3 cycles de congélation -décongélation et utilisé pour infecter la lignée de complémentation A549-E1+ et produire un pré-stock viral. Le profil de l'ADN adénoviral est analysé selon la technique de Hirth (Glutzman et Von Doren, 1983, J. Virol. 45, 91- 103). Le stock viral est produit par amplification des particules sur la lignée A549-E1+ et les virions sont purifiés sur gradient de chlorure de césium. Le titre viral en ufp (unités formant des plages) est déterminé selon les techniques de l'art par titration sur cellules 293. Le nombre de particules infectieuses ui (unités infectieuses) est évalué par immunofluorescence de la protéine adénovirale DBP utilisant un anticorps anti-DBP (Reich et al., 1983, Virology 128, 480-484).

EXEMPLE 2 : Construction d'un vecteur adénoviral exprimant le dérivé RANTES

humain délété des 8 premiers résidus (RANTES  $\Delta$ 1-8).

Le dérivé RANTES  $\Delta$ 1-8 est obtenu par mutagenèse dirigée du vecteur M13TG6219 avec l'oligonucléotide oTG11428 (SEQ ID NO: 3), afin de déléter les  
5 8 premiers acides aminés de la protéine mature. Après vérification de la mutagenèse par séquençage, le fragment *HindIII-EcoRV* du vecteur M13TG6267 ainsi généré est introduit dans le plasmide de transfert pTG8348. Après digestion du vecteur en résultant par *PacI* et *BstEII* et recombinaison homologue avec pTG4656 coupé par *ClaI*, on génère pTG6283 lequel est délété des régions E1 (nt 459 à 3328) et E3 (nt  
10 28592 à 30470) et comporte la cassette "prom RSV - intron - RANTES  $\Delta$ 1-8 - pA  $\beta$ -globine" à la place des séquences E1. Les adénovirus recombinants AdTG6283 sont produits selon la méthode indiquée ci-dessus.

EXEMPLE 3 : Evaluation *in vitro* de l'effet antiviral des adénovirus AdTG6232,  
15 AdTG6264 et AdTG6283.

Les cellules-cibles humaines A549 ou simiennes Vero sont infectées par les adénovirus recombinants à une multiplicité d'infection égale à 50 ou à 100. Les surnageants de culture sont récoltés 48 et 72 heures après infection, et sont  
20 centrifugés pendant 5 minutes à 3500 rpm afin d'éliminer les débris cellulaires. Le RANTES est dosé dans les surnageants de culture par ELISA (kit R&D Systems # DRN00). Sa concentration varie entre 200 et 1000 ng/ml selon les productions.

Puis, on évalue la capacité du RANTES produit par les virions recombinants à inhiber l'infection des cellules lymphocytaires PM1 par le virus VIH. Pour ce faire,  
25 elles sont mises en présence des surnageants cellulaires obtenus de la lignée A549 ou Vero infectée par les adénovirus recombinants AdTG6232 ou AdTG6264. On évalue la concentration de RANTES dans les surnageants recueillis par ELISA. Les cellules PM1 sont pré-incubées en présence de surnageant comprenant 500 ng RANTES /  $10^6$

cellules pendant 2 heures, puis éprouvées par le VIH1, isolat M-tropique Bal (multiplicité d'infection  $10^{-3}$  ou  $10^{-4}$ ). La culture est poursuivie en présence de surnageant comprenant 100 ng/ml de RANTES à partir de J3. La réplication du VIH est suivie par analyse de l'activité de la transcriptase-inverse dans les surnageants de culture PM1 (voir par exemple Virology Methods Manual 1996, ed. B. Mahy and H. Kangro Academic Press, Harcourt Brace & Company Publishers). On utilise à titre de contrôle du RANTES obtenu par voie recombinante. Une nette inhibition de l'infection virale peut être observée en présence des surnageants des cellules infectées par l'AdTG6232 ou AdTG6264 ou de la protéine recombinante.

Des expériences de dose-réponse sont effectuées comme suit. Les cellules PM1 sont mises en pré-incubation avec les surnageants de cellules infectées par AdTG6232 ou AdTG6264 contenant des doses variables de RANTES (0 - 50 - 100 - 500 ng /  $10^6$  cellules). La culture est poursuivie en présence des surnageants cellulaires contenant des doses de RANTES variant de 5 à 100 ng/ml (5 - 25 - 50 - 75 - 100 ng/ml). Les cellules sont ainsi protégées vis-à-vis d'une infection virale jusqu'à 25 ng/ml RANTES, quelle que soit les conditions de pré-incubation.

EXEMPLE 4 : Evaluation *in vivo* des adénovirus AdTG6232, AdTG6264 et AdTG6283.

20

Les différentes constructions ont été injectées à des souris immunocompétentes C57Black/6 et immunodéficientes SCID afin de suivre l'expression du RANTES ou de son dérivé RANTES  $\Delta 1-8$ , d'analyser la persistance du génome adénoviral, ainsi qu'une éventuelle toxicité liée à l'expression constitutive et forte des chimiokines.

25

En premier lieu,  $5 \times 10^9$  ui d'adénovirus recombinants AdTG6232 et AdTG6283 sont injectées par voie intraveineuse à des souris immunocompétentes C57Black/6. La concentration sérique en RANTES et RANTES  $\Delta 1-8$  est déterminée par ELISA comme indiqué précédemment. On a pu détecter de 140 à 200 ng/ml de sérum dans

les animaux ayant reçu les virions AdTG6232, le maximum d'expression se situant à J3. Les souris injectées avec la construction AdTG6283 produisent 23 à 85 ng/ml de RANTES  $\Delta$ 1-8 pendant plus de 30 jours après l'injection. Ces données confirment la fonctionnalité des virions de l'invention.

5 L'ADN isolé des foies de souris traitées est analysé par la technique de Southern à l'aide d'une sonde spécifique reconnaissant la jonction E3/E4 du génome Ad5. On observe une persistance du génome adénoviral dans les cellules hépatiques jusqu'à 30 jours après l'injection, quel que soit le vecteur injecté. En outre, les expériences d'anatomo-pathologie réalisées sur les foies des souris traitées n'ont pas mis en  
10 évidence une quelconque toxicité des adénovirus exprimant le RANTES. On utilise à titre de contrôle des animaux injectés avec un vecteur adénoviral non recombinant.

Des expériences similaires sont réalisées en souris immunodéficientes SCID: les animaux traités avec les virions AdTG6232 et AdTG6283 produisent des quantités de RANTES et RANTES  $\Delta$ 1-8 comprises entre 130 à 630 ng/ml. La concentration  
15 sérique est légèrement plus faible (20 à 60 ng/ml) dans le cas des souris injectées avec l'AdTG6264. En outre, l'expression est stable et persistente sur plus de 30 jours lorsque l'on met en oeuvre les vecteurs utilisant le promoteur viral RSV (AdTG6264 et AdTG6283). Les analyses par la technique de Southern montrent la persistance du génome adénoviral jusqu'à plus de 30 jours après l'injection, quel que soit le vecteur  
20 utilisé. L'injection des constructions virales s'accompagne d'une certaine toxicité de type hépatique surtout dans le cas de l'AdTG6232, probablement liée à l'état d'immunodéficiency des animaux.

EXEMPLE 5 : Evaluation *in vitro* et *in vivo* de l'effet antiviral de RANTES sur les  
25 PBL humains.

1. Evaluation *in vitro* de l'effet antiviral de RANTES sur les PBL humains.

Les PBL (pour peripheral blood lymphocyte en anglais ou lymphocytes périphériques) humains ont été prélevés chez des sujets sains, purifiés et stimulés pendant 48 heures en présence d'IL2 et d'anticorps anti-CD3. Les cultures de PBL

sont pré-incubées pendant 2 heures en présence de surnageant de RANTES (100 ng/10<sup>6</sup> cellules) produit après infection de cellules Véro ou A549 par les vecteurs adénoviraux AdTG6332 ou AdTG6264. Les PBL sont ensuite éprouvés par le VIH1, isolat M-tropique Bal (multiplicité d'infection 10<sup>-4</sup>). La culture est poursuivie en  
5 présence de surnageant comprenant 50 ng/ml de RANTES à partir de J3. La réplication du VIH est suivie par analyse de l'activité de la transcriptase-inverse dans les surnageants de culture des PBL. Une nette inhibition de l'infection virale peut être observée en présence de RANTES produit par vecteur adénoviral après infection de cellules A549 ou Vero. Ces résultats sont illustrés sur la figure 1 qui montre la mesure  
10 de l'activité transcriptase inverse dans les surnageants de culture PBL. Il apparaît clairement que l'activité transcriptase inverse chez les PBL infectés par le VIH après incubation en présence de surnageant RANTES est comparable à l'activité détectée chez les PBL non infectés, alors qu'une activité transcriptase inverse sensiblement plus importante est détectée chez les PBL infectés par le VIH.

15

## 2. Evaluation *in vivo* de l'effet antiviral de RANTES.

L'évaluation *in vivo* de l'effet antiviral de RANTES est effectuée en modèle murin de souris *scid/scid* immunodéficientes implantées avec des PBL humains. Les PBL sont criblés au préalable afin de déterminer un donneur permettant d'obtenir une  
20 inhibition de l'infection virale *in vitro* par RANTES.

Le vecteur adénoviral AdTG9338 (RSV-FIX) exprimant le facteur IX (Anson et al., EMBO, vol.3, no.5, pages 1053, 1984) est obtenu par une méthode analogue à celle ayant permis l'obtention de AdTG6264 (RSV-RANTES).

Les vecteurs adénoviraux AdTG6264 et AdTG9338 (5.10<sup>9</sup>iu) sont injectés par voie rétroorbitaire en souris *scid/scid* à J0. 2,6.10<sup>7</sup> PBL humains sont administrés aux  
25 souris à J2, par voie intrapéritonéale. L'épreuve virale est réalisée 14 jours après l'infection adénovirale en injectant 5000 TCID<sub>50</sub> de l'isolat VIH1 M-tropique Bal par voie intrapéritonéale. Les souris sont sacrifiées à J28 afin d'analyser la charge virale.



Un prélèvement sanguin est réalisé avant l'épreuve VIH (à J4) afin de déterminer l'expression de RANTES et du facteur IX humain. La quantification de RANTES et du FIX est réalisée au moment du sacrifice (J28). La mesure de la charge virale est réalisée à J21 et à J28.

5

**EXEMPLE 6 : Evaluation *in vivo* de l'effet antiviral de RANTES en modèle macaque/SIV.**

L'évaluation de l'effet antiviral en modèle macaque est effectuée sur 5 groupes d'animaux selon le schéma établi dans le tableau ci-dessous :

10

Tableau 1 :

| groupes             | adénovirus<br>5.10 <sup>10</sup> iu/kg |
|---------------------|--|
| G1 : témoin pos.    | AdTG6401*                              |
| G2 : RANTES         | AdTG6264                               |
| G3 : RANTESΔ1-8     | AdTG6283                               |
| G4 : SDF-1          | AdTG13221                              |
| G5 : RANTES + SDF-1 | AdTG6264 + AdTG13221                   |

\*AdTG6401 est utilisé comme contrôle négatif de l'infection adénovirale ; c'est un adénovirus de première génération dont le squelette adénoviral est identique à celui des autres vecteurs impliqués, mais ne véhicule aucune cassette d'expression.

15

L'évaluation de l'effet antiviral est menée en parallèle sur un lot de singes sains au moment de l'injection des adénovirus et un lot de singes déjà contaminés par le

SIV. Les adénovirus recombinants sont administrés aux singes par injection intraveineuse. Une épreuve virale est réalisée sur le lot de singes sains 14 jours après l'infection adénovirale en injectant 10 AID/singe. La charge virale et l'expression des chimiokines sont mesurées, en suivant le même protocole que  
5 celui utilisé précédemment, à J 28.

Revendications

1. Un vecteur viral recombinant dans le génome duquel est inséré les séquences  
codant pour au moins un polypeptide permettant d'inhiber ou retarder la liaison  
5 d'un virus d'immunodéficience à une cellule cible et/ou la pénétration dudit  
virus dans ladite cellule, ledit vecteur viral n'étant pas un vecteur adénoviral  
dans le génome duquel est inséré l'ADNc codant pour le RANTES murin.
2. Un vecteur viral recombinant selon la revendication 1, caractérisé en ce que le  
10 polypeptide est un ligand d'un récepteur cellulaire, ledit récepteur facilitant la  
liaison et/ ou la pénétration d'un virus d'immunodéficience dans la cellule cible.
3. Un vecteur viral recombinant selon la revendication 1 ou 2, caractérisé en ce  
que le polypeptide est un ligand d'un récepteur, ledit récepteur facilitant la  
15 liaison et/ ou la pénétration du virus de l'immunodéficience acquise (VIH) dans  
la cellule cible, éventuellement en association avec CD4.
4. Un vecteur viral recombinant selon la revendication 3, caractérisé en ce que  
ledit polypeptide est un ligand d'un récepteur choisi parmi le groupe constitué  
20 par les récepteurs CCR-5, CXCR-4, CCR1, CCR-2B, CCR-3, CCR8, US28,  
BOB, BONZO, GPR1, V28, le récepteur putatif de MDC, APJ et CCR9.
5. Un vecteur viral recombinant selon la revendication 3 ou 4, caractérisé en ce  
que le ligand est choisi parmi le groupe constitué par les ligands RANTES,  
25 MIP-1 $\alpha$ , MIP-1 $\beta$  et SDF-1, notamment d'origine humaine.
6. Un vecteur viral recombinant selon l'une des revendications 1 à 5, caractérisé  
en ce que le polypeptide est un dérivé d'un polypeptide natif, en particulier un  
dérivé antagoniste.

7. Un vecteur viral recombinant selon la revendication 6, caractérisé en ce que le polypeptide est un dérivé antagoniste du RANTES et, notamment le dérivé RANTESΔ1-8 ou le dérivé Met-RANTES.

5

8. Un vecteur viral recombinant selon la revendication 6, caractérisé en ce que le polypeptide est un dérivé antagoniste de SDF-1 et notamment un peptide comprenant les 9 acides aminés N-terminaux de SDF-1.

- 10 9. Un vecteur viral recombinant selon l'une des revendications 1 à 8, caractérisé en ce qu'il dérive d'un adénovirus.

- 15 10. Un vecteur viral recombinant selon la revendication 9, caractérisé en ce qu'il dérive d'un adénovirus dépourvu au moins de la majorité de la région E1 et, de façon optionnelle, de tout ou partie de la région E3.

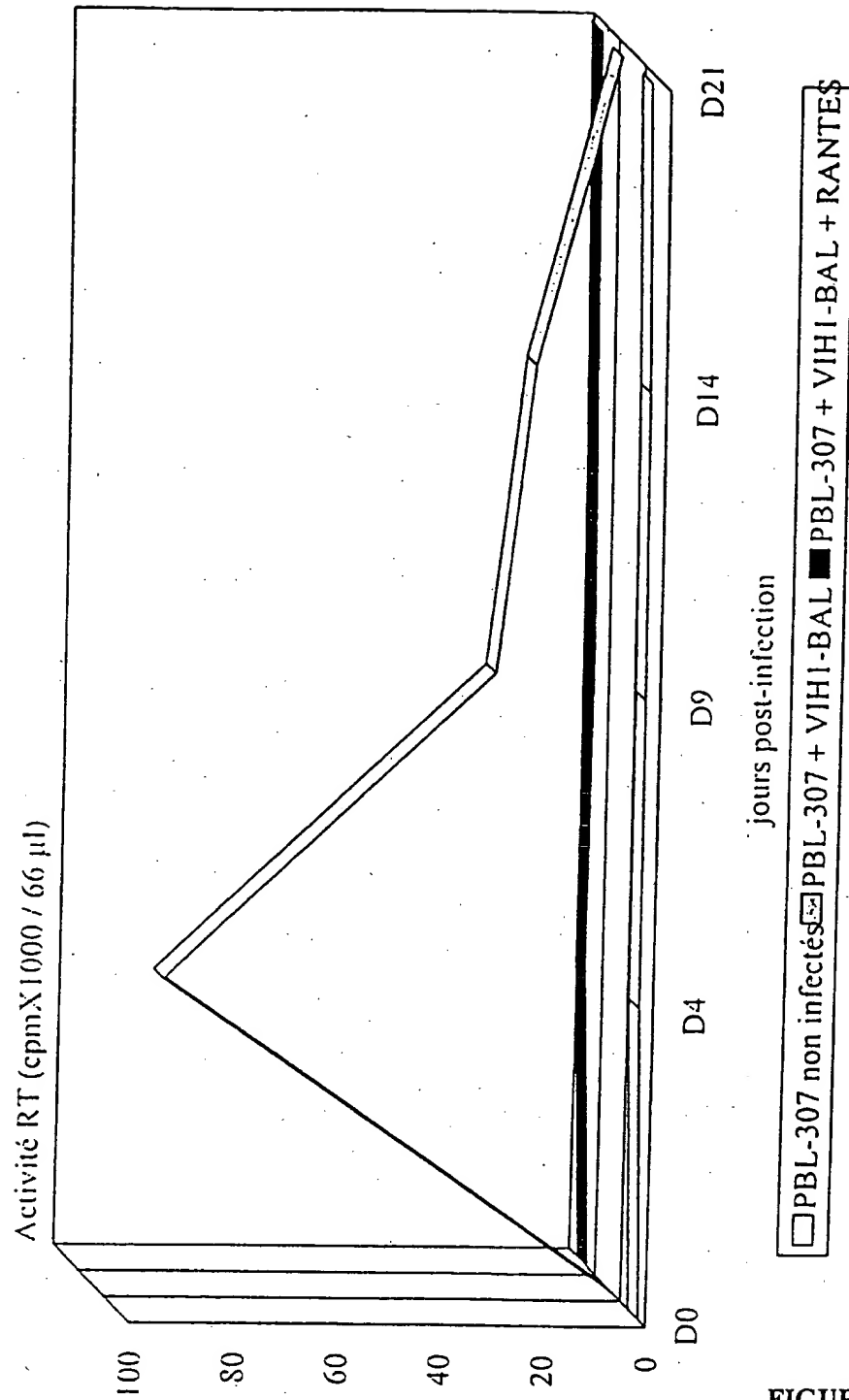
11. Un vecteur viral recombinant selon la revendication 9 ou 10, caractérisé en ce qu'il dérive d'un adénovirus :

- 20 (1) dépourvu de tout ou partie de la région E1 et, de manière optionnelle, de tout ou partie de la région E3,
- (2) dépourvu de tout ou partie des régions E1 et E2 et, de manière optionnelle, de tout ou partie de la région E3,
- (3) dépourvu de tout ou partie des régions E1 et E4 et, de manière optionnelle, de tout ou partie de la région E3,
- 25 (4) dépourvu de tout ou partie des régions E1 et E4 et, de manière optionnelle, de tout ou partie de la région E3, et comportant une mutation non fonctionnelle de la région E2, ou
- (5) dépourvu de tout ou partie des régions E1, E2 et E4 et, de manière optionnelle de tout ou partie de la région E3.

12. Un vecteur viral recombinant selon l'une des revendications 9 à 11, caractérisé en ce qu'il dérive d'un adénovirus d'origine humaine, canine, aviaire, bovine, murine, ovine, porcine ou simienne ou encore d'un hybride comprenant des fragments de génome adénoviral d'au moins deux origines différentes.
13. Un vecteur viral recombinant selon l'une des revendications 9 à 12, caractérisé en ce que les séquences codant pour ledit polypeptide sont placées sous le contrôle du promoteur précoce du virus CMV (Cytomégalo virus), du promoteur RSV (Rous Sarcoma Virus) ou d'un promoteur foie spécifique éventuellement couplé à l'ApoE enhancer.
14. Un vecteur viral recombinant selon l'une des revendications 9 à 13, caractérisé en ce qu'il dérive d'un adénovirus dépourvu de l'essentiel des régions E1 et E3 et dans lequel est insérée à la place de la région E1 une cassette d'expression comportant un promoteur choisi parmi les promoteurs CMV, RSV ou un promoteur foie-spécifique, une séquence d'épissage, l'ADNc codant pour le RANTES humain ou son dérivé RANTES  $\Delta$ 1-8 ou le dérivé Met-RANTES et une séquence de polyadénylation.
15. Une particule virale infectieuse comprenant un vecteur viral selon l'une des revendications 1 à 14.
16. Une cellule hôte eucaryote comprenant un vecteur viral selon l'une des revendications 1 à 14 ou infectée par une particule virale infectieuse selon la revendication 15.
17. Un procédé de préparation d'une particule virale infectieuse selon la revendication 15, selon lequel :

- (i) on introduit ledit vecteur viral dans une cellule de complémentation capable de compléter *en trans* ledit vecteur, de manière à obtenir une cellule de complémentation transfectée,
- (ii) on cultive ladite cellule de complémentation transfectée dans des conditions appropriées pour permettre la production de ladite particule virale infectieuse, et
- (iii) on récupère ladite particule virale infectieuse dans la culture cellulaire.
- 10 18. Une composition pharmaceutique comprenant à titre d'agent thérapeutique ou prophylactique au moins un vecteur viral selon l'une des revendications 1 à 14, une particule virale infectieuse selon la revendication 15 ou obtenue en mettant en oeuvre un procédé de préparation selon la revendication 17 ou une cellule hôte eucaryote selon la revendication 16, en association avec un support acceptable d'un point de vue pharmaceutique.
- 15
19. Une composition pharmaceutique selon la revendication 18, destinée au traitement des maladies d'immunodéficience et, plus particulièrement du SIDA.
- 20 20. Une composition pharmaceutique selon la revendication 18 ou 19, en vue d'une administration intraveineuse.
- 25 21. Utilisation thérapeutique ou prophylactique d'au moins un vecteur viral selon l'une des revendications 1 à 14, d'une particule virale infectieuse selon la revendication 15 ou obtenue en mettant en oeuvre un procédé de préparation selon la revendication 16 ou d'une cellule hôte eucaryote selon la revendication 16, pour la préparation d'un médicament destiné au traitement des maladies d'immunodéficience par thérapie génique.

22. Utilisation thérapeutique ou prophylactique d'un vecteur adénoviral dans le  
génom duquel est inséré l'ADNc codant pour le RANTES murin ou d'un  
vecteur plasmidique comprenant les séquences codant pour au moins un  
polypeptide permettant d'inhiber ou retarder la liaison d'un virus  
5 d'immunodéficience à une cellule cible et/ou la pénétration dudit virus dans  
ladite cellule, pour la préparation d'un médicament destiné au traitement des  
maladies d'immunodéficience par thérapie génique.
23. Utilisation thérapeutique ou prophylactique selon la revendication 22,  
10 caractérisée en ce que ledit polypeptide a les caractéristiques énoncées aux  
revendications 2 à 8.
24. Utilisation thérapeutique ou prophylactique selon l'une des revendications 21  
à 23, pour la préparation d'un médicament destiné au traitement du SIDA par  
15 thérapie génique.



**FIGURE 1**



## LISTE DE SEQUENCES

5

## (1) INFORMATION GENERALE:

## (i) DEPOSANT:

10

- (A) NOM: Transgene S.A.
- (B) RUE: 11 rue de Molsheim
- (C) VILLE: Strasbourg
- (E) PAYS: France
- (F) CODE POSTAL: 67082
- (G) TELEPHONE: 03 88 27 91 00
- (H) TELECOPIE: 03 88 27 91 11

15

## (ii) TITRE DE L' INVENTION: Vecteurs permettant d'inhiber ou retarder

la

20

liaison d'un virus d'immunodeficiency et/ou sa penetration  
dans une cellule hôte.

## (iii) NOMBRE DE SEQUENCES: 3

## (iv) FORME LISIBLE PAR ORDINATEUR:

25

- (A) TYPE DE SUPPORT: Tape
- (B) ORDINATEUR: IBM PC compatible
- (C) SYSTEME D' EXPLOITATION: PC-DOS/MS-DOS
- (D) LOGICIEL: PatentIn Release #1.0, Version #1.25 (OEB)

30

## (2) INFORMATION POUR LA SEQ ID NO: 1:

## (i) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE:

35

- (A) LONGUEUR: 30 paires de bases
- (B) TYPE: acide nucléique
- (C) NOMBRE DE BRINS: simple
- (D) CONFIGURATION: linéaire

40

## (ii) TYPE DE MOLECULE: ADNc

## (iii) HYPOTHETIQUE: NON

## (iii) ANTI-SENS: OUI

45

## (vi) ORIGINE:

- (A) ORGANISME: Homo sapiens
- (C) INDIVIDUEL ISOLE: amorce PCR et RT-PCR oTG10794  
(clonage ADNc RANTES humain)

50

## (xi) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE: SEQ ID NO: 1:

AAGTTCAGGT TTCTAGAGGT ACCATCCTAG

30

55

## (2) INFORMATION POUR LA SEQ ID NO: 2:

## (i) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE:

(A) LONGUEUR: 27 paires de bases  
(B) TYPE: acide nucléique  
(C) NOMBRE DE BRINS: simple  
(D) CONFIGURATION: linéaire

5 (ii) TYPE DE MOLECULE: ADNc  
(iii) HYPOTHETIQUE: NON  
10 (iii) ANTI-SENS: NON  
(vi) ORIGINE:  
(A) ORGANISME: Homo sapiens  
(C) INDIVIDUEL ISOLE: amorce PCR oTG10793 (clonage ADNc  
15 RANTES humain)  
(xi) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE: SEQ ID NO: 2:  
20 CCTCTCTAGA GGTACCATGG GGGTCTC 27  
(2) INFORMATION POUR LA SEQ ID NO: 3:  
(i) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE:  
25 (A) LONGUEUR: 30 paires de bases  
(B) TYPE: acide nucléique  
(C) NOMBRE DE BRINS: simple  
(D) CONFIGURATION: linéaire  
30 (ii) TYPE DE MOLECULE: ADNc  
(iii) HYPOTHETIQUE: NON  
(iii) ANTI-SENS: NON  
35 (vi) ORIGINE:  
(A) ORGANISME: Homo sapiens  
(C) INDIVIDUEL ISOLE: oligo de mutagenese oTG11428 (RANTES  
40 del 1-8)  
(xi) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE: SEQ ID NO: 3:  
GCTCCTGCAT CTGCCCCCTG CTGCTTTGCC 30  
45

# INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No

PCT/FR 98/02503

## A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

IPC 6 C12N15/86 C07K14/52 A61K48/00 C07K14/715

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

## B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

IPC 6 C12N A61K C07K

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)

## C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

| Category | Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages   | Relevant to claim No. |
|----------|--|-----------------------|
| X        | MEBATION, T. ET AL.: "A CXCR4/CD4 pseudotype rhabdovirus that selectively infects HIV-1 envelope protein-expressing cells" CELL, vol. 90, no. 5, 5 September 1997, pages 841-847, XP002096379<br>NA US | 1-4, 15, 16           |
| Y        | see the whole document<br>---  | 1-4, 6                |
| X        | WO 97 19696 A (LUSSO PAOLO ; GALLO ROBERT C (US); COCCHI FIORENZA (US); VICO ANTHO) 5 June 1997<br>see page 14, line 35 - page 19, line 27<br>---<br>-/--  | 1-8, 14-24            |

☒ Further documents are listed in the continuation of box C.

☒ Patent family members are listed in annex.

\* Special categories of cited documents:

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

"E" earlier document but published on or after the international filing date

"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art.

"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

12 March 1999

Date of mailing of the international search report

26/03/1999

Name and mailing address of the ISA

European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2  
NL - 2280 HV Rijswijk  
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,  
Fax: (+31-70) 340-3016

Authorized officer

Chambonnet, F

# INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Intern. Application No

PCT/FR 98/02503

## C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

| Category | Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages   | Relevant to claim No.        |
|----------|--|------------------------------|
| X        | WO 97 32019 A (EUROSCREEN S A ;SAMSON MICHEL (FR); PARMENTIER MARC (BE); VASSART) 4 September 1997<br>see claims 11,12,14,22-26,36,64,89<br>---  | 1-4,16,<br>18,19,21          |
| X        | WO 97 28258 A (NAT INST HEALTH)<br>7 August 1997<br><br>see page 25, line 5 - page 30, line 24;<br>claims 7-15,18,19,50-56<br>---  | 1-4,6,<br>15,16,<br>18-21,24 |
| X        | BRACIAK, T.A. ET AL.: "Overexpression of RANTES using a recombinant adenovirus vector induces the tissue-directed recruitment of monocytes to the lung" JOURNAL OF IMMUNOLOGY., vol. 157, 1996, pages 5076-5084, XP002075217<br>BALTIMORE US<br>cited in the application | 1-5,8,<br>15-17              |
| Y        | rôle rantes et mip contre hiv<br>see the whole document<br>---   | 1-9                          |
| A        | ARENZANA-SEISDEDOS F ET AL: "HIV BLOCKED BY CHEMOKINE ANTAGONIST" NATURE, vol. 383, no. 6599, 3 October 1996, page 400 XP002027718<br>cited in the application<br>see the whole document<br>---  | 7                            |
| P,X      | WO 97 44462 A (CLARK LEWIS IAN ;ARENZANA SEISDEDOS FERNANDO (FR); VIRELIZIER JEAN) 27 November 1997<br>see page 6, line 27 - page 13, line 24<br>see page 17, line 3 - line 10; claims<br>---  | 1-8,15,<br>16,18-24          |
| P,X      | FR 2 751 658 A (PASTEUR INSTITUT)<br>30 January 1998<br>see page 11, line 3 - line 9; claims 1-19,33-35<br>---   | 1-5,15,<br>18-21,24          |
| Y        | COCCHI F ET AL: "IDENTIFICATION OF RANTES, MIP-1ALPHA, AND MIP-1BETA AS THE MAJOR HIV-SUPPRESSIVE FACTORS PRODUCED BY CD8+ T CELLS" SCIENCE, vol. 270, 15 December 1995, pages 1811-1815, XP000616644<br>see the whole document<br>---                                   | 1-5,7,9                      |

-/--

# INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Intern. Application No

PCT/FR 98/02503

## C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

| Category | Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages   | Relevant to claim No. |
|----------|--|-----------------------|
| Y        | WU B L ET AL: "INTERACTION OF CHEMOKINE RECEPTOR CCR5 WITH ITS LIGANDS: MULTIPLE DOMAINS FOR HIV-1 GP120 BINDING AND A SINGLE DOMAIN FOR CHEMOKINE BINDING" JOURNAL OF EXPERIMENTAL MEDICINE, vol. 186, no. 8, 20 October 1997, pages 1373-1381, XP002060734<br>see the whole document | 1-5                   |
| Y        | ALKHATIB G ET AL: "CC CKR5: A RANTES, MIP-1ALPHA, MIP-1BETA RECEPTOR AS A FUSION COFACTOR FOR MACROPHAGE-TROPIC HIV.1" SCIENCE, vol. 272, 28 June 1996, pages 1955-1958, XP002055728<br>see the whole document   | 1-5                   |
| Y        | WO 97 37005 A (PROGENICS PHARM INC)<br>9 October 1997<br>see the whole document  | 1-6                   |
| A        | GONG J -H ET AL: "RANTES AND MCP-3 ANTAGONISTS BIND MULTIPLE CHEMOKINE RECEPTORS" JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY, vol. 271, no. 18, 3 May 1996, pages 10521-10527, XP002047804  | 2,6                   |
| A        | WO 94 12635 A (ICOS CORP) 9 June 1994<br>see claims 2,12,13,34   | 4                     |
| P,X      | WO 97 45543 A (COMBADIÈRE CHRISTOPHE ; FENG YU (US); US HEALTH (US); ALKHATIB GHAL)<br>4 December 1997<br>see page 25, line 17 - page 29, line 27;<br>claims 18-24,59,62-65  | 1-6                   |
| Y        | REEVES, J.D. ET AL.: "CD4-independent infection by HIV-2 (ROD/B): use of the 7/transmembrane receptors CXCR-4, CCR-3 and V28 for entry" VIROLOGY, vol. 231, no. 1, January 1997, pages 130-134, XP002096015<br>RLANDO US<br>see the whole document                                     | 1-4                   |
| Y        | BLEUL C C ET AL: "THE LYMPHOCYTE CHEMOATTRACTANT SDF-1 IS A LIGAND FOR LESTR/FUSIN AND BLOCKS HIV-1 ENTRY" NATURE, vol. 382, no. 6594, 29 August 1996, pages 829-832, XP002028003<br>see the whole document  | 1,2,6,8               |

-/--

# INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No

PCT/FR 98/02503

| C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT |  |                       |
|--|--|-----------------------|
| Category   | Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages   | Relevant to claim No. |
| P,Y  | <p>ZHANG, Y. J. ET AL.: "Use of coreceptors others than CCR5 by non-syncytium-inducing adult and pediatric isolates of Human Immunodeficiency Virus type 1 is rare in vitro"</p> <p>JOURNAL OF VIROLOGY.,<br/>vol. 72, no. 11, November 1998, pages 9337-9344, XP002096016</p> <p>ICAN SOCIETY FOR MICROBIOLOGY US</p> <p>see the whole document</p> | 1-4                   |
| P,Y  | <p>EDINGER, A.L. ET AL.: "Use of GPR1, GPR15 and STRL33 as coreceptors by diverse Human Immunodeficiency Virus type 1 and Simian Immunodeficiency Virus envelope proteins"</p> <p>VIROLOGY.,<br/>vol. 249, no. 2, 30 September 1998, pages 367-378, XP002096017</p> <p>RLANDO US</p> <p>see the whole document</p>                                   | 1-4                   |
| P,Y  | <p>WO 98 42354 A (UNIV MARYLAND BIOTECHNOLOGY IN) 1 October 1998</p> <p>see the whole document</p>   | 1-6                   |
| E  | <p>WO 99 06561 A (LAUTENS LAURA ;TIFFANY H LEE (US); ALKHATIB GHALIB (US); BAZAN HER) 11 February 1999</p> <p>see page 29, line 20 - page 33, line 10; claims 14,15,17-22,57,60-63</p>   | 1-6                   |

# INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/FR 98/02503

## Box I Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 1 of first sheet)

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. ☒ Claims Nos.:  
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:  
  
Observation: Although Claims 21 to 24 concern a method for treatment of the human or animal body, the search was carried out on the basis of the effects attributed to the product.
2. ☐ Claims Nos.:  
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:
3. ☐ Claims Nos.:  
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

## Box II Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 2 of first sheet)

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:

1. ☐ As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.
2. ☐ As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional fee, this Authority did not invite payment of any additional fee.
3. ☐ As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:
4. ☐ No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

Remark on Protest

- ☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest.  
☐ No protest accompanied the payment of additional search fees.

# INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International Application No

PCT/FR 98/02503

| Patent document<br>cited in search report |   | Publication<br>date | Patent family<br>member(s)  | Publication<br>date  |
|---|---|---------------------|---|--|
| WO 9719696                                | A | 05-06-1997          | AU 1141997 A<br>EP 0869812 A  | 19-06-1997<br>14-10-1998   |
| WO 9732019                                | A | 04-09-1997          | CA 2247989 A<br>EP 0883687 A  | 04-09-1997<br>16-12-1998   |
| WO 9728258                                | A | 07-08-1997          | AU 1834197 A<br>EP 0854918 A  | 22-08-1997<br>29-07-1998   |
| WO 9744462                                | A | 27-11-1997          | FR 2748938 A<br>AU 3036997 A  | 28-11-1997<br>09-12-1997   |
| FR 2751658                                | A | 30-01-1998          | AU 3854797 A<br>WO 9804698 A  | 20-02-1998<br>05-02-1998   |
| WO 9737005                                | A | 09-10-1997          | AU 2607497 A  | 22-10-1997   |
| WO 9412635                                | A | 09-06-1994          | AT 164884 T<br>CA 2128208 A<br>DE 69317883 D<br>DE 69317883 T<br>EP 0630405 A<br>EP 0846762 A<br>ES 2118372 T<br>JP 7503145 T<br>US 5759804 A | 15-04-1998<br>09-06-1994<br>14-05-1998<br>12-11-1998<br>28-12-1994<br>10-06-1998<br>16-09-1998<br>06-04-1995<br>02-06-1998 |
| WO 9745543                                | A | 04-12-1997          | AU 3375697 A  | 05-01-1998   |
| WO 9842354                                | A | 01-10-1998          | AU 6587598 A  | 20-10-1998   |
| WO 9906561                                | A | 11-02-1999          | NONE  |  |



# RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Dem: Internationale No

PCT/FR 98/02503

| <b>A. CLASSEMENT DE L'OBJET DE LA DEMANDE</b><br>CIB 6 C12N15/86 C07K14/52 A61K48/00 C07K14/715   |  |  |
|---|--|--|
| Selon la classification internationale des brevets (CIB) ou à la fois selon la classification nationale et la CIB   |  |  |
| <b>B. DOMAINES SUR LESQUELS LA RECHERCHE A PORTE</b><br>Documentation minimale consultée (système de classification suivi des symboles de classement)<br>CIB 6 C12N A61K C07K   |  |  |
| Documentation consultée autre que la documentation minimale dans la mesure où ces documents relèvent des domaines sur lesquels a porté la recherche   |  |  |
| Base de données électronique consultée au cours de la recherche internationale (nom de la base de données, et si réalisable, termes de recherche utilisés)  |  |  |
| <b>C. DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS</b>   |  |  |
| Catégorie   | Identification des documents cités, avec, le cas échéant, l'indication des passages pertinents   | no. des revendications visées  |
| X   | MEBATION, T. ET AL.: "A CXCR4/CD4 pseudotype rhabdovirus that selectively infects HIV-1 envelope protein-expressing cells"<br>CELL,<br>vol. 90, no. 5, 5 septembre 1997, pages 841-847, XP002096379<br>NA US | 1-4, 15, 16  |
| Y   | voir le document en entier<br>---  | 1-4, 6   |
| X   | WO 97 19696 A (LUSSO PAOLO ; GALLO ROBERT C (US); COCCHI FIORENZA (US); VICO ANTHO)<br>5 juin 1997<br>voir page 14, ligne 35 - page 19, ligne 27<br>---<br>-/--  | 1-8, 14-24   |
| <input checked="" type="checkbox"/> Voir la suite du cadre C pour la fin de la liste des documents <input checked="" type="checkbox"/> Les documents de familles de brevets sont indiqués en annexe   |  |  |
| * Catégories spéciales de documents cités:<br>"A" document définissant l'état général de la technique, non considéré comme particulièrement pertinent<br>"E" document antérieur, mais publié à la date de dépôt international ou après cette date<br>"L" document pouvant jeter un doute sur une revendication de priorité ou cité pour déterminer la date de publication d'une autre citation ou pour une raison spéciale (telle qu'indiquée)<br>"O" document se référant à une divulgation orale, à un usage, à une exposition ou tous autres moyens<br>"P" document publié avant la date de dépôt international, mais postérieurement à la date de priorité revendiquée<br>"T" document ultérieur publié après la date de dépôt international ou la date de priorité et n'appartenant pas à l'état de la technique pertinent, mais cité pour comprendre le principe ou la théorie constituant la base de l'invention<br>"X" document particulièrement pertinent; l'invention revendiquée ne peut être considérée comme nouvelle ou comme impliquant une activité inventive par rapport au document considéré isolément<br>"Y" document particulièrement pertinent; l'invention revendiquée ne peut être considérée comme impliquant une activité inventive lorsque le document est associé à un ou plusieurs autres documents de même nature, cette combinaison étant évidente pour une personne du métier<br>"Z" document qui fait partie de la même famille de brevets |  |  |
| Date à laquelle la recherche internationale a été effectivement achevée<br><br>12 mars 1999   |  | Date d'expédition du présent rapport de recherche internationale<br><br>26/03/1999 |
| Nom et adresse postale de l'administration chargée de la recherche internationale<br>Office Européen des Brevets, P.B. 5818 Patentlaan 2<br>NL - 2280 HV Rijswijk<br>Tel. (+31-70) 340-2040. Tx. 31 651 epo nl.<br>Fax: (+31-70) 340-3016   |  | Fonctionnaire autorisé<br><br>Chambonnet, F  |

# RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Démo Internationale No

PCT/FR 98/02503

| C.(suite) DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS |  |                               |
|---|--|-------------------------------|
| Catégorie                                       | Identification des documents cités. avec le cas échéant, l'indication des passages pertinents  | no. des revendications visées |
| X   | WO 97 32019 A (EUROSCREEN S A ; SAMSON MICHEL (FR); PARMENTIER MARC (BE); VASSART) 4 septembre 1997<br>voir revendications<br>11,12,14,22-26,36,64,89<br>---   | 1-4,16,<br>18,19,21           |
| X   | WO 97 28258 A (NAT INST HEALTH)<br>7 août 1997<br><br>voir page 25, ligne 5 - page 30, ligne 24;<br>revendications 7-15,18,19,50-56<br>---   | 1-4,6,<br>15,16,<br>18-21,24  |
| X   | BRACIAK, T.A. ET AL.: "Overexpression of RANTES using a recombinant adenovirus vector induces the tissue-directed recruitment of monocytes to the lung" JOURNAL OF IMMUNOLOGY., vol. 157, 1996, pages 5076-5084, XP002075217<br>BALTIMORE US<br>cité dans la demande | 1-5,8,<br>15-17               |
| Y   | rôle rantes et mip contre hiv<br>voir le document en entier<br>---   | 1-9                           |
| A   | ARENZANA-SEISDEDOS F ET AL: "HIV BLOCKED BY CHEMOKINE ANTAGONIST" NATURE, vol. 383, no. 6599, 3 octobre 1996, page 400 XP002027718<br>cité dans la demande<br>voir le document en entier<br>---  | 7                             |
| P,X   | WO 97 44462 A (CLARK LEWIS IAN ; ARENZANA SEISDEDOS FERNANDO (FR); VIRELIZIER JEAN) 27 novembre 1997<br>voir page 6, ligne 27 - page 13, ligne 24<br>voir page 17, ligne 3 - ligne 10;<br>revendications<br>---  | 1-8,15,<br>16,18-24           |
| P,X   | FR 2 751 658 A (PASTEUR INSTITUT)<br>30 janvier 1998<br>voir page 11, ligne 3 - ligne 9;<br>revendications 1-19,33-35<br>---   | 1-5,15,<br>18-21,24           |
| Y   | COCCHI F ET AL: "IDENTIFICATION OF RANTES, MIP-1ALPHA, AND MIP-1BETA AS THE MAJOR HIV-SUPPRESSIVE FACTORS PRODUCED BY CD8+ T CELLS" SCIENCE, vol. 270, 15 décembre 1995, pages 1811-1815, XP000616644<br>voir le document en entier<br>---                           | 1-5,7,9                       |
|   | ---  |                               |

-/--

# RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Dema. internationale No

PCT/FR 98/02503

| C.(suite) DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS |   |                               |
|---|---|-------------------------------|
| Catégorie                                       | Identification des documents cités, avec le cas échéant, l'indication des passages pertinents   | no. des revendications visées |
| Y   | <p>WU B L ET AL: "INTERACTION OF CHEMOKINE RECEPTOR CCR5 WITH ITS LIGANDS: MULTIPLE DOMAINS FOR HIV-1 GP120 BINDING AND A SINGLE DOMAIN FOR CHEMOKINE BINDING" JOURNAL OF EXPERIMENTAL MEDICINE, vol. 186, no. 8, 20 octobre 1997, pages 1373-1381, XP002060734<br/>voir le document en entier</p> <p>---</p> | 1-5                           |
| Y   | <p>ALKHATIB G ET AL: "CC CKR5: A RANTES, MIP-1ALPHA, MIP-1BETA RECEPTOR AS A FUSION COFACTOR FOR MACROPHAGE-TROPIC HIV.1" SCIENCE, vol. 272, 28 juin 1996, pages 1955-1958, XP002055728<br/>voir le document en entier</p> <p>---</p>   | 1-5                           |
| Y   | <p>WO 97 37005 A (PROGENICS PHARM INC) 9 octobre 1997<br/>voir le document en entier</p> <p>---</p>   | 1-6                           |
| A   | <p>GONG J -H ET AL: "RANTES AND MCP-3 ANTAGONISTS BIND MULTIPLE CHEMOKINE RECEPTORS" JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY, vol. 271, no. 18, 3 mai 1996, pages 10521-10527, XP002047804</p> <p>---</p>   | 2,6                           |
| A   | <p>WO 94 12635 A (ICOS CORP) 9 juin 1994<br/>voir revendications 2,12,13,34</p> <p>---</p>  | 4                             |
| P,X   | <p>WO 97 45543 A (COMBADIÈRE CHRISTOPHE ; FENG YU (US); US HEALTH (US); ALKHATIB GHAL) 4 décembre 1997<br/>voir page 25, ligne 17 - page 29, ligne 27; revendications 18-24,59,62-65</p> <p>---</p>   | 1-6                           |
| Y   | <p>REEVES, J.D. ET AL.: "CD4-independent infection by HIV-2 (ROD/B): use of the 7/transmembrane receptors CXCR-4, CCR-3 and V28 for entry" VIROLOGY, vol. 231, no. 1, janvier 1997, pages 130-134, XP002096015<br/>RLANDO US<br/>voir le document en entier</p> <p>---</p>                                    | 1-4                           |
| Y   | <p>BLEUL C C ET AL: "THE LYMPHOCYTE CHEMOATTRACTANT SDF-1 IS A LIGAND FOR LESTR/FUSIN AND BLOCKS HIV-1 ENTRY" NATURE, vol. 382, no. 6594, 29 août 1996, pages 829-832, XP002028003<br/>voir le document en entier</p> <p>---</p>  | 1,2,6,8                       |
|   | <p>---</p> <p>---/---</p>   |                               |

# RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Démo: Internationale No  
PCT/FR 98/02503

| C.(suite) DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS |  |                               |
|---|--|-------------------------------|
| Catégorie                                       | Identification des documents cités. avec le cas échéant. l'indication des passages pertinents  | no. des revendications visées |
| P,Y   | ZHANG, Y. J. ET AL.: "Use of coreceptors others than CCR5 by non-syncytium-inducing adult and pediatric isolates of Human Immunodeficiency Virus type 1 is rare in vitro"<br>JOURNAL OF VIROLOGY.,<br>vol. 72, no. 11, novembre 1998, pages 9337-9344, XP002096016<br>ICAN SOCIETY FOR MICROBIOLOGY US<br>voir le document en entier<br>---- | 1-4                           |
| P,Y   | EDINGER, A.L. ET AL.: "Use of GPR1, GPR15 and STRL33 as coreceptors by diverse Human Immunodeficiency Virus type 1 and Simian Immunodeficiency Virus envelope proteins"<br>VIROLOGY.,<br>vol. 249, no. 2, 30 septembre 1998, pages 367-378, XP002096017<br>RLANDO US<br>voir le document en entier<br>----                                   | 1-4                           |
| P,Y   | WO 98 42354 A (UNIV MARYLAND BIOTECHNOLOGY IN) 1 octobre 1998<br>voir le document en entier<br>----  | 1-6                           |
| E   | WO 99 06561 A (LAUTENS LAURA ; TIFFANY H LEE (US); ALKHATIB GHALIB (US); BAZAN HER) 11 février 1999<br>voir page 29, ligne 20 - page 33, ligne 10; revendications 14,15,17-22,57,60-63<br>-----  | 1-6                           |

# RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Demande internationale n°

PCT/FR 98/02503

## Cadre I Observations - lorsqu'il a été estimé que certaines revendications ne pouvaient pas faire l'objet d'une recherche (suite du point 1 de la première feuille)

Conformément à l'article 17.2)a), certaines revendications n'ont pas fait l'objet d'une recherche pour les motifs suivants:

1. ☒ Les revendications n<sup>os</sup> se rapportent à un objet à l'égard duquel l'administration n'est pas tenue de procéder à la recherche, à savoir:  
Remarque: Bien que les revendications 21 à 24 concernent une méthode de traitement du corps humain/animal, la recherche a été effectuée et basée sur les effets imputés au produit
2. ☐ Les revendications n<sup>os</sup> se rapportent à des parties de la demande internationale qui ne remplissent pas suffisamment les conditions prescrites pour qu'une recherche significative puisse être effectuée, en particulier:
3. ☐ Les revendications n<sup>os</sup> sont des revendications dépendantes et ne sont pas rédigées conformément aux dispositions de la deuxième et de la troisième phrases de la règle 6.4.a).

## Cadre II Observations - lorsqu'il y a absence d'unité de l'invention (suite du point 2 de la première feuille)

L'administration chargée de la recherche internationale a trouvé plusieurs inventions dans la demande internationale, à savoir:

1. ☐ Comme toutes les taxes additionnelles ont été payées dans les délais par le déposant, le présent rapport de recherche internationale porte sur toutes les revendications pouvant faire l'objet d'une recherche.
2. ☐ Comme toutes les recherches portant sur les revendications qui s'y prêtaient ont pu être effectuées sans effort particulier justifiant une taxe additionnelle, l'administration n'a sollicité le paiement d'aucune taxe de cette nature.
3. ☐ Comme une partie seulement des taxes additionnelles demandées a été payée dans les délais par le déposant, le présent rapport de recherche internationale ne porte que sur les revendications pour lesquelles les taxes ont été payées, à savoir les revendications n<sup>os</sup>
4. ☐ Aucune taxe additionnelle demandée n'a été payée dans les délais par le déposant. En conséquence, le présent rapport de recherche internationale ne porte que sur l'invention mentionnée en premier lieu dans les revendications; elle est couverte par les revendications n<sup>os</sup>

Remarque quant à la réserve

- ☐ Les taxes additionnelles étaient accompagnées d'une réserve de la part du déposant.
- ☐ Le paiement des taxes additionnelles n'était assorti d'aucune réserve.

# RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Renseignements relatifs aux membres de familles de brevets

Dema. Internationale No

PCT/FR 98/02503

| Document brevet cité<br>au rapport de recherche |   | Date de<br>publication | Membre(s) de la<br>famille de brevet(s)   | Date de<br>publication   |
|---|---|------------------------|---|--|
| WO 9719696                                      | A | 05-06-1997             | AU 1141997 A<br>EP 0869812 A  | 19-06-1997<br>14-10-1998   |
| WO 9732019                                      | A | 04-09-1997             | CA 2247989 A<br>EP 0883687 A  | 04-09-1997<br>16-12-1998   |
| WO 9728258                                      | A | 07-08-1997             | AU 1834197 A<br>EP 0854918 A  | 22-08-1997<br>29-07-1998   |
| WO 9744462                                      | A | 27-11-1997             | FR 2748938 A<br>AU 3036997 A  | 28-11-1997<br>09-12-1997   |
| FR 2751658                                      | A | 30-01-1998             | AU 3854797 A<br>WO 9804698 A  | 20-02-1998<br>05-02-1998   |
| WO 9737005                                      | A | 09-10-1997             | AU 2607497 A  | 22-10-1997   |
| WO 9412635                                      | A | 09-06-1994             | AT 164884 T<br>CA 2128208 A<br>DE 69317883 D<br>DE 69317883 T<br>EP 0630405 A<br>EP 0846762 A<br>ES 2118372 T<br>JP 7503145 T<br>US 5759804 A | 15-04-1998<br>09-06-1994<br>14-05-1998<br>12-11-1998<br>28-12-1994<br>10-06-1998<br>16-09-1998<br>06-04-1995<br>02-06-1998 |
| WO 9745543                                      | A | 04-12-1997             | AU 3375697 A  | 05-01-1998   |
| WO 9842354                                      | A | 01-10-1998             | AU 6587598 A  | 20-10-1998   |
| WO 9906561                                      | A | 11-02-1999             | AUCUN   |  |